

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2003年1月30日(30.01.2003)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 03/008594 A1

BEST AVAILABLE COPY

(51) 国际分类号⁷: C12N 15/62, 15/63

(21) 国际申请号: PCT/CN01/01301

(22) 国际申请日: 2001年9月3日(03.09.2001)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01126298.2 2001年7月20日(20.07.2001) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 建力福生化技术(上海)有限公司(GENE-LIFE BIOCHEMICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) LIMITED) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江高科技园区郭守敬路351号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 孙树汉(SUN, Shuhan) [CN/CN]; 颜宏利(YAN, Hongli) [CN/CN]; 陈蕊雯(CHEN, Ruiwen) [CN/CN]; 中国上海市翔殷路800号第二军医大学医学遗传学教研室, Shanghai 200433 (CN)。 秦沪兴(CHUN, Dexter, H., H.) [CN/CN]; 中国上海市宛平南路宛南华侨新村19号102室, Shanghai 200030 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: CONSTRUCTION OF THE PLASMID FOR EXPRESSING THE THROMBUS-TARGETING THROMBOLYTIC FUSION PROTEIN

(54) 发明名称: 一种血栓靶向性溶栓蛋白表达质粒及其构建

(57) Abstract: The application provides a fusion gene anx32-scuPA that is fused by one gene coding for annexin 32 and another coding for the site 144 to 411 of the amino acid sequence of the single chain urokinase. The length of the cyclic double strand thermal induced plasmid (pJM-anx32-scuPA) of the fusion gene is 6.8 Kb. Transforming the E. coli using the plasmid (pJM-anx32-scuPA) produces the engineering bacterium K802 of the application. The fusion gene of the application can express the fusion protein complexed by the annexin 32 and the site 144 to 411 of the amino acid sequence of the single chain urokinase. The fusion protein has the double function of anticoagulation and thrombolytics. It has the high efficiency in treating thrombolytic disorders and will not cause the side effect of hemorrhage.

(57) 摘要

本发明提供一种编码膜联蛋白 32 的基因和编码单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因的融合基因 anx32-scuPA; 所述融合基因的热诱导性表达质粒 pJM- anx32-scuPA, 长度为 6.8 Kb 的环形双链; 以及该质粒转化大肠杆菌菌株 K802 制备的工程菌 K802(pJM- anx32-scuPA)。本发明所提供的融合基因可表达膜联蛋白 32(膜联蛋白 32)和单链尿激酶的 144~411 位氨基酸(scu-PA(144~411))的融合蛋白。该融合蛋白具有抗凝和溶解血栓的双重功能, 不仅溶栓效率高, 而且不会引起出血等副作用。

WO 03/008594 A1

一种血栓靶向性溶栓蛋白表达质粒及其构建

技术领域

本发明涉及医药生物技术领域，具体涉及用基因工程方法制备血栓靶向性溶栓蛋白表达质粒。

背景技术

血栓症，如急性心肌梗塞(AMI)、静脉血栓栓塞等是一类严重危及人类健康及生命的心血管疾病。在西方国家，因血栓引起的死亡已占人口总死亡率的首位。在我国，随着经济发展和人口趋向老龄化，血栓症患者日益增多，对抗血栓药物的需求也越来越大。目前临床上常用的溶栓药物主要为纤溶酶原激活剂，如链激酶(SK)、尿激酶(UK)、单链尿激酶(scu-PA)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)等，这些药物虽然都具有较强的溶栓效果，但均存在许多缺点：(1)出血：由于这些药物不仅激活纤维蛋白凝块中的纤溶酶原，同时也激活血浆中的纤溶酶原，使血浆中纤溶酶活性增高。血浆纤溶酶水解凝血因子 VII 等，从而使凝血因子减少而引起出血。(2)体内半衰期短，治疗用量大。(3)再梗死：纤溶系统被激活后可活化血小板，使纤维蛋白原和 Von Willebrand 因子聚集于血小板 GpIIb/IIIa 受体，促使血栓形成。因此溶栓后短时间内容易再次形成血栓，使治疗失败。

低分子量单链尿激酶(scu-PA(144~411))是单链尿激酶(scu-PA)的衍生物，由 scu-PA 的 144~411 位氨基酸残基组成，其溶栓性质和 scu-PA 类似，出血副作用较小，但缺乏对纤维蛋白的特异亲和力，因而溶栓的效率不高，临床的应用受到限制。

因此，开发新型的效力更强、溶栓专一性更好、并能有效预防再栓塞的溶栓制剂是目前抗血栓药物研究的热点。

发明内容

本发明者曾从猪囊尾蚴 cDNA 文库中克隆到的一个新基因——膜联蛋白 32(Anx 32)基因(孙树汉等，囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆，中国寄生虫学与寄生虫杂志，1997，15(1)：15-20)。该基因编码 347 个氨基酸的蛋白质，分子量 38KDa。在钙离子存在的情况下，膜联蛋白 32 可以高亲和性、

特异性地与酸性磷脂结合。血液凝固过程可以分为三个阶段：(1)血小板活化阶段。血小板磷脂膜的不对称性发生改变，原来居于质膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)暴露。(2)血小板表面反应阶段。从凝血因子 X 到凝血酶的形成，此系列反应均需在血小板膜的表面进行。(3)纤维蛋白形成阶段。凝血酶使纤维蛋白原转变成成为纤维蛋白。由于膜联蛋白 32 可以高亲和性地结合活化血小板的膜磷脂，因而可以竞争性抑制凝血因子的激活，起到抗凝血的作用。

在此基础上，本发明人进行了膜联蛋白 32 与 scu-PA(144~411)融合表达研究，完成了本发明。

本发明提供一种融合基因 anx32-scuPA，所述融合基因包含序列表的序列 1 所示的编码膜联蛋白 32 的基因和序列 3 所示的编码单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因的融合物。

本发明还提供一种热诱导型表达质粒 pJM- anx32-scuPA，所述表达质粒为长度 6.8 Kb 的环形双链，克隆有编码膜联蛋白 32 和单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因序列，并含有 P_{RPL} 启动子。

本发明进一步提供一种工程菌 K802(pJM- anx32-scuPA)，为大肠杆菌 K802 JLF1，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC No. M201020。

本发明的融合基因 anx32-scuPA 是通过如下步骤进行制备的：将序列 1 所示编码膜联蛋白 32 的基因和序列 3 所示编码单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因分别用 PCR 方法扩增；然后采用重叠区延伸法连接。

本发明的表达质粒 pJM- anx32-scuPA 的构建，系将融合基因 anx32-scuPA 用 EcoR I、Sal I 双酶切，然后与用 EcoR I、Sal I 双酶切的载体 pJM 连接。

本发明人构建的膜联蛋白 32 和 scu-PA(144~411)的融合表达质粒能融合表达膜联蛋白 32 与 scu-PA(144~411)，表达产物能保留各自的生物学活性，从而可得到一种具有抗凝和溶栓双重功能的新型溶栓药物。前以述及，现有溶栓药物主要通过活化纤溶酶来溶解血栓，而血小板对纤溶酶的作用不敏感，因而这些药物对富含血小板的血栓治疗效果较差。而膜联蛋白 32 除了本身具有的抗凝血功能外，因其特异性结合活化的血小板，所以可将 scu-PA(144~411)靶向性地结合在血栓部位，从而可以大大提高对富含血小板的动脉血栓的治疗效果。

另外，本发明采用热诱导型表达载体，可降低大规模培养时的成本，以利于规模化生产。因膜联蛋白 32 和单链尿激酶的生物学活性不受是否糖基化

的影响，所以本发明可采用原核表达系统，根据需要也可采用酵母表达系统或哺乳动物细胞表达系统。

附图说明

- 5 图 1 重叠区延伸法构建质粒 pJM-anx32-scuPA 示意图
图 2 质粒 pJM-anx32-scuPA 酶切电泳图
其中：泳道 1： DNA 标记
泳道 2： PCR #1 扩增的 anx32 基因
泳道 3： PCR #2 扩增的低分子量单链尿激酶基因
10 泳道 4： 质粒 pJM-anx32-scuPA 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切
图 3 融合蛋白 ANX32-SCUPA 的表达和纯化
其中：泳道 1： 未诱导的菌体蛋白
泳道 2： 诱导后 1 小时菌体蛋白
泳道 3： 诱导后 2 小时菌体蛋白
15 泳道 4： 诱导后 3 小时菌体蛋白
泳道 5： 菌体超声后上清液(几乎无目的蛋白)
泳道 6： 菌体超声后沉淀(有大量目的蛋白)
泳道 7： 纯化后目的蛋白
泳道 8： 蛋白分子量标准
20 泳道 9： Western 印迹法表明纯化蛋白为含单链尿激酶的融合蛋白

具体实施方式

- 本发明中所用的含有 anx32 全长基因的质粒 pUC19-anx32 由本教研室保存(参见孙树汉等，囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆，中国寄生虫学
25 与寄生虫杂志，1997，15(1)：15-20)；低分子量单链尿激酶(scu-PA(144~411))
基因参照人尿激酶原 cDNA 序列(该序列可以在基因数据库(Genbank)得到，
序列号：M15476)，其中部分氨基酸改成了大肠杆菌偏爱的密码子，由上海生
工公司人工合成，具体改动方法参照文献(马忠等：人尿激酶原(pro-urokinase)
基因在大肠杆菌的高效表达，生物化学和生物物理学报，1995，27(1)：17-
30 22)；热诱导型表达载体 pJM 源自质粒 pJLA-503，由 M. kreg 博士惠赠(参见
M.kreg et al. Inducible expression vectors incorporating the

Escherichia coli a^{tp} translational initiation region, Gene, 52(1987) 279-283); 质粒扩增所用的宿主菌为 DH10B, 蛋白表达所用的宿主菌为 K802(以上两种菌株均购自 GIBCO 公司)。

5 实施例 1 融合基因 anx32- scu-PA(144~411)的获得

见图 1, 将编码膜联蛋白 32 的基因和编码单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因分别用 PCR 方法扩增; 然后采用重叠区延伸法连接, 得到融合基因 anx32-scu-PA(144~411)。具体步骤如下:

(1)用引物 a 和引物 b 扩增膜联蛋白 32 基因的全部编码基因。 其中引物 a 为 5'TG GAATTC ATGGCCTACTGTCGCTCCC3', 该引物与 anx32 编码序列的 5'端一致, 同时引入 EcoR I 限制性内切酶位点。引物 b 为: 5'GCCACACTGAAATTTTAA/TGCAGGGCCGATGAG3', 其中 5'端 18bp 与单链尿激酶编码序列的 5'端一致, 后面的 15bp 与 anx32 基因的 3'端互补。采用高保真 pfu DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 其中 dNTP 浓度为 20M, Mg²⁺浓度为 1.5mM, 变性、退火、延伸的温度分别为 94℃、55℃、72℃, 时间分别为 45 秒、4 秒和 1 分钟, 共进行 30 个循环。

(2)用引物 c 和 d 扩增低分子量单链尿激酶(scu-PA(144~411))的编码序列片断。 引物 c 为: 5' CTCATCGGCCCTGCA/TTAAAATTTTCAGTGTGGC3', 该引物的 5'端 15bp 与 anx32 的 3'端一致, 后面 18bp 与低分子量单链尿激酶的 5'端的序列一致。引物 d 为: 5'TTGTCGAC GCA GAG GGC CAG GCC3', 该引物与低分子量单链尿激酶编码序列的 3'端序列互补。同时引入 Sal I 限制性内切酶位点。PCR 反应程序同 (1), 共进行 30 个循环。

(3)利用重叠区延伸法获得编码膜联蛋白 32 和低分子量单链尿激酶的融合基因。 上述两步 PCR 反应得到的产物分别利用 1.0%琼脂糖电泳分离, 然后作凝胶回收。回收后的产物 94℃变性 5 分钟, 将两次 PCR 的产物混合后于 50℃退火。因为引物 b 和 c 具有重叠的部分, 因而退火后可以使 anx32 基因的单链和 scu-PA(144~411)的单链配对。添加 DNA 聚合酶、MgCl₂、10×PCR 缓冲液、dNTP 后, 进行 PCR 扩增。利用这种方法, 使两个基因连接成一个融合基因 anx32- scu-PA(144~411)。为保证高保真的扩增, 整个 PCR 程序均采用 TaKaRa 公司的 pfu DNA 聚合酶, 50μl 反应体系, 变性、退火、延伸的温度分别为 94℃、50℃、72℃, 时间分别为 45 秒、45 秒和 1 分钟, 共进行 20 个循

环(具体方法参见《靶向新基因的分子克隆策略-理论与方法》，军事医学科学出版社，1999 出版)。

实施例 2 表达质粒 pJM-anx32- scuPA 的构建

- 5 利用引物 a 和 d 对上述方法扩增得到的融合基因 anx32- scu-PA(144~411) 进行测序，测序反应由上海基康公司完成。经测序正确后，用 EcoR I、Sal I 双酶切，与用 EcoR I、Sal I 双酶切的载体 pJM 连接。酶切和连接反应的限制性内切酶和 T₄ 连接酶均购自 TaKaRa 公司，反应采用酶说明书所推荐的体系进行。本发明所利用的热诱导型表达载体 pJM 全长 4.9Kb(千碱基对)，含有噬
- 10 菌体 P_RP_L 启动子、热诱导基因 CI1857、质粒复制起点(ori)和氨苄抗性基因 (AP^r)。

具体反应过程如下：利用 EcoR I、Sal I 对上述 PCR 产物及载体进行双酶切，反应采用高盐(H)缓冲体系，37℃酶切 3 小时。然后经 1.0%琼脂糖电泳分离后，作凝胶回收。酶切片断和载体按照 5: 1 的摩尔比混合，加入相应

15 的连接缓冲溶液和 T₄连接酶，16℃连接 12 小时。

实施例 3 工程菌的制备

将上述连接后的产物转化大肠杆菌菌株 K802，得到工程菌 K802(pJM-anx32-scuPA)。

- 20 具体步骤为：先将宿主菌 K802 于 50mlLB 培养基(含 1%的胰蛋白胨，0.5%酵母提取物和 1%氯化钠，pH7.0)中，37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4 时，在 4℃下，以 4000rpm 的转速离心，收集宿主菌；去除上清液后，用 1~2ml 冰预冷的 100mmol/L 的氯化钙溶液重悬，即得感受态细菌。将 100ng 上述构建的质粒与感受态细菌于冰浴中冷却 30 分钟，42℃热休克 90 秒，然后再于冰浴中冷
- 25 却 10 分钟。加入 0.8ml 的 LB，于 37℃培养 1 小时后，取 0.2 ml 转化产物涂布于含有相应抗生素的 LB 琼脂平板上，37℃培养 12-15 小时后，即获得单克隆的含有重组质粒的宿主菌。抽提宿主菌的质粒，用 EcoR I、Sal I 双酶切能够切出一条 1.8Kb 的条带，该宿主菌即为阳性重组子(附图 2)。含有质粒 pJM-anx32-scuPA 的大肠杆菌菌株 K802 为工程菌 K802(pJM- anx32-scuPA)。

实施例 4 融合蛋白 ANX32-SCUPA 的表达和纯化

见附图 3, 工程菌 K802(pJM- anx32-scuPA)通过温度诱导的方式, 可以表达膜联蛋白 32 和低分子量单链尿激酶的融合蛋白 ANX32-SCUPA(泳道 2, 3, 4), 表达蛋白大部分以包含体的形式存在(泳道 5, 6), 表达量可以占到菌体蛋白的 20%以上。蛋白纯化后, 10% SDS-PAGE 电泳, 经考马氏亮蓝染色, 显示为单一条带, 分子量为 68kDa(泳道 7)。

(1) 融合蛋白诱导表达

分别挑取上述工程菌的单菌落至 100ml 含氨苄 50mg/L 的 LB 培养基中, 28℃振荡培养过夜。次日, 取 100ml 菌液接种至含氨苄 50mg/L 的 1L LB 培养基中, 继续在 28℃振荡培养, 至细菌生长到对数期(分光光度计检测, 波长为 600nm 处吸光值为 $A_{600}=0.4-0.5$)时, 将培养液置于 70℃热水浴中快速升温至 42℃, 再于 42℃振荡培养 5~7 小时, 最终 A_{600} 可增至 1.2 左右。

(2) 包含体的分离和粗蛋白的制备

将诱导表达后的菌液 7700g 离心 10 分钟, 以收集菌体。按照每克湿重的菌体沉淀 3 ml 的比例加入缓冲溶液(50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0)悬浮沉淀。加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL, 0℃冰浴 15 分钟; 然后超声破菌, 超声功率 100 W, 30 秒/次, 显微镜检查菌体破碎情况。当菌体基本破碎后停止超声。超声液 10000g 离心 15 分钟, 弃去上清液。沉淀用 9 倍体积的洗涤液(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 8.0)洗涤两次。

通过上述方法制备的包含体加入 5 ml 裂解液(8 M 尿素, 0.5 M NH_4Cl , 500 mM Tris-HCl, pH 8.5), 室温振荡 4 小时。然后 7700g 离心将不溶的部分除去。利用这种方法可以制备含量约 70%的粗蛋白。

(3) 融合蛋白纯化

粗蛋白进一步经 Sephacryl S-400 凝胶层析柱(Pharmacia 公司)纯化。平衡和洗脱液均为 5 M 尿素, 0.5 NH_4Cl , 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 10 mM DTT。SDS-PAGE 分析, 收集含有目的蛋白的洗脱液, -20℃保存。

上述样品透析 12 小时, 透析液为 10 倍体积的 5 M 尿素, 0.5 NH_4Cl , 50 mM Tris-HCl, pH 8.5。尿激酶原含有 12 对二硫键, 因此在透析过程中应注意去除透析液中氧气。先将透析液超声除气 10 分钟, 然后通入 N_2 5 分钟, 最后用 parafilm 膜将透析的三角烧瓶密封。

透析后的样品逐滴加入 100 倍体积的缓冲液，含 2 M 尿素，0.5 NH_4Cl ，50 mM Tris-HCl，0.5 mM EDTA，1.25 mM 还原型谷胱甘肽，0.5 mM 氧化型谷胱甘肽，pH 8.5。4℃ 轻轻搅动 24 小时，然后再加入 0.5 mM 氧化型谷胱甘肽，继续搅动 24 小时。最后，样品在 12 倍体积的缓冲溶液 10 mM Tris-HCl，pH 8.0 中透析 12 小时。透析后的样品利用超滤膜浓缩。

上述样品再用弱阴离子交换柱(层析介质为二乙胺基乙基琼脂糖，DEAE Sepharose Fast Flow，Pharmacia 公司)进行离子交换层析。层析柱用 50mM Tris · HCl, pH8.0 平衡。洗脱盐浓度从 0~1mol/L NaCl 进行等浓度梯度洗脱，流速为 1ml/分钟。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定重组蛋白所在的峰值，发现在盐浓度为 0.4 M 时重组蛋白被洗脱下来。收集峰值洗脱液，经 10% SDS-PAGE 电泳分离，考马氏亮蓝染色显示为 68kDa 的单一蛋白条带，说明已得到纯的重组蛋白 ANX32-SCUPA。

利用 Western 印迹法检测重组蛋白的表达。具体方法为：表达的重组蛋白 10% SDS-PAGE 分离后，电转移至硝酸纤维素膜上，电流为 0.65mA/cm²，时间为 2 小时。加入 TBST 缓冲液(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 8.3)洗三次。加入 TBST+5%的脱脂奶粉，37℃振摇 1 小时。然后弃去封闭液，以 1: 50 的比例加入抗单链尿激酶的抗体，37℃振摇 1 小时。弃去上述液体，TBST 洗涤三次，加入二抗，37℃振摇 30 分钟。用 TBST 洗涤三次，加入二氨基联苯胺显色液显色，结果为一条单一的条带(附图 3，泳道 9)。以上方法可参见卢圣栋主编的《现代分子生物学实验技术》，第二版，400-403 页。

采用考马斯亮兰染色法(Bradford 法)测定纯化蛋白浓度,计算回收率。将所得蛋白冷冻干燥后分装，置-20℃保存。

申请人或代理人档案号 013633

国际申请号 PCT/CN01/01301

关于微生物保藏的说明

(细则13之二)

A. 对说明书第 <u>2</u> 页, 第 <u>15-16</u> 行所述的微生物的说明。	
B. 保藏事项 <u>大肠杆菌</u>	其他保藏在补充页中 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称 <u>中国典型培养物保藏中心</u>	
保藏单位地址 <u>中国武汉 武汉大学</u> 邮编: <u>430072</u> (包括邮政编码和国名)	
保藏日期 <u>2001. 6. 11</u>	保藏编号 <u>CCTCC NO: M 201020</u>
C. 补充说明 (必要时) 本栏内容有补充页 <input type="checkbox"/>	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写

☒ 本页已经和国际申请一起收到

受权官员

由国际局填写

☐ 国际局收到本页日期:

受权官员

PCT/RO/134表(1992年7月)

权 利 要 求 书

1. 融合基因 anx32-scuPA, 所述融合基因包含序列 1 所示编码膜联蛋白 32 的基因和序列 3 所示编码单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因的融合物:

5 序列 1:

1 atggcctact gtcgctccct ggttcatcta tatgccccca atggagagaa gtacaaaccg
61 actattaccc caacacccgg gttctcaccg accgctgatg ctgagcactt gaagcgtgca
121 atgcgaggac ttggcacgaa tgaacgtgcg atcattgaca ttcttgga aa ccgaacttca
181 gccgaaagaa tggccattcg tgacgcctat ccgtcgattt ccagcaagac cctgcacgat
10 241 gctctaacca gcgagctgag tggcaagttc cggaggttcg ccttggttgc aatccaatca
301 ccgtggcagg tgatggcaga ggctctttac gacgccatga agggggctgg cactaaggaa
361 cgcgtactca atgaaattat tgccgggtgt tcaaaggatg acatccctca gttgaaaaaa
421 gcttttgaag aagtgagcgg aggagaaacc cttgatgatg cgatcaaggg ggacacgagt
481 ggcgactacc gcgaggccct tctgctagcg ctgcgccgtc aggctgatga accacaggcg
15 541 atgcaactca aaaacctaac accctccact ctgagtcagg ttgtgaatcc cggccttgct
601 gaaacggatg cgaaggagct gtacgcctgc ggtgaggggc gcccgggcac agcagagagt
661 cgtttcatgc gtcctatcgt caatcgctca ttccttcaat taaacgcaac gaatgaggct
721 tacaatcggg cctacggta cccgttgatt gatgcaataa agaaggagac gtcgagagac
781 cttgaggact ttctcataac tagagttcgc tacgccactg atcgcgccag tctgtttgcc
20 841 gaactccttc actttgccat gagaggagct ggcaccaagg actccacttt gcaacgtggt
901 cttgccttga gggctgatac tgatctagga agcatcaagg agaagtatgc ggagctctat
961 ggtgaaacct tggaagcggc aatcaagggt gatacttctg gtgactatga ggctctctgc
1021 ttgaaactca tcggccctgc ataa

序列 3:

25 1 aagaattaaa atttcagtgt ggccaaaaga ctctgaggcc ccgctttaag attattgggg
61 gagaattcac caccatcgag aaccagccct ggtttgcggc catctacagg aggcaccggg
121 ggggctctgt cacctacgtg tgtggaggca gcctcatcag cccttgctgg gtgatcagcg
181 ccacacactg cttcattgat tacccaaaga aggaggacta catcgtctac ctgggtcgct
241 caaggcttaa ctccaacacg caaggggaga tgaagtttga ggtggaaaac ctcatcctac
30 301 acaaggacta cagcgctgac acgcttgctc accacaacga cattgccttg ctgaagatcc
361 gttccaagga gggcagggtg gcgcagccat cccggactat acagaccatc tgccctgcct

401 atgtataaag cgatccccag ttggcaciaa gctgtgagat cactggcttt ggaaaagaga
 481 attctaccga ctatctctat ccggagcagc tgaaaatgac tgttgtgaag ctgatttccc
 541 accgggagtg tcagcagccc cactactacg gctctgaagt caccacaaa atgctatgtg
 601 ctgctgaccc ccaatggaaa acagattcct gccagggaga ctgaggggga cccctcgtct
 5 661 gtccctcca aggccgatg actttgactg gaattgtgag ctggggccgt ggatgtgccc
 721 tgaaggacia gccagcgctc tacacgagag tctcacactt cttaccctgg atccgcagtc
 781 acaccaagga agagaatggc c.

2. 融合基因 anx32-scuPA 的制备方法, 其特征在于包括如下步骤: 将如下编码膜联蛋白 32 的基因

10 1 atggcctact gtcgctccct ggttcactta tatgccccca atggagagaa gtacaaaccg
 61 actattaccc caacaccggt gttctcaccg accgctgatg ctgagcactt gaagcgtgca
 121 atgcgaggac ttggcacgaa tgaacgtgcg atcattgaca ttcttggaac ccgaacttca
 181 gccgaaagaa tggccattcg tgacgcctat ccgtcgattt ccagcaagac cctgcacgat
 241 gctctaacca gcgagctgag tggcaagttc cggaggttcg ccttggtgct aatccaatca
 15 301 ccgtggcagg tgatggcaga ggctctttac gacgccatga agggggctgg cactaaggaa
 361 cgcgtactca atgaaattat tgccgggtgt tcaaaggatg acatccctca gttgaaaaaa
 421 gcttttgaag aagtgagcgg aggagaaacc cttgatgatg cgatcaaggg ggacacgagt
 481 ggcgactacc gcgaggccct tctgctagcg ctgcgggtc aggctgatga accacaggcg
 541 atgcaactca aaaacctaac accctccact ctgagtcagg ttgtgaatcc cggccttgct
 20 601 gaaacggatg cgaaggagct gtacgcctgc ggtgaggggc gcccgggcac agcagagagt
 661 cgtttcatgc gtcctatcgt caatcgctca ttcttcaat taaacgcaac gaatgaggct
 721 tacaatcggg cctacgggtca cccgttgatt gatgcaataa agaaggagac gtcgagagac
 781 cttgaggact ttctcataac tagagttcgc tacgccactg atcgcgccag tctgtttgcc
 841 gaactccttc actttgccat gagaggagct ggcaccaagg actccacttt gcaacgtggt
 25 901 cttgccttga gggctgatac tgatctagga agcatcaagg agaagtatgc ggagctctat
 961 ggtgaaacct tggaagcggc aatcaagggt gatacttctg gtgactatga ggctctctgc
 1021 ttgaaactca tcggccctgc ataa

和编码单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因

1 aagaattaaa atttcagtgt ggccaaaaga ctctgaggcc ccgctttaag attattgggg
 30 61 gagaattcac caccatcgag aaccagccct gggttgcggc catctacagg aggcaccggg
 121 ggggctctgt cacctacgtg tgtggaggca gcctcatcag cccttgctgg gtgatcagcg

181 ccacacactg cttcattgat tacccaaaga aggaggacta catcgtctac ctgggtcgct
241 caaggcttaa ctccaacacg caaggggaga tgaagtttga ggtggaaaac ctcatcctac
301 acaaggacta cagcgtgac acgcttgctc accacaacga cattgccttg ctgaagatcc
362gttccaagga gggcaggtgt gcgcagccat cccggactat acagaccatc tgcctgcctt
5 402 atgtataaag cgatccccag tttggcacia gctgtgagat cactggcttt ggaaaagaga
481 attctaccga ctatctctat ccggagcagc tgaatatgac tgttgtgaag ctgatttccc
541 accgggagtg tcagcagccc cactactacg gctctgaagt caccacaaaa atgctatgtg
601 ctgctgaccc ccaatggaaa acagattcct gccagggaga ctcaggggga cccctcgtct
661 gttccctcca aggccgcatg actttgactg gaattgtgag ctggggccgt ggatgtgccc
10 721 tgaaggacia gccaggcgtc tacacgagag tctcacactt cttaccctgg atccgcagtc
781 acaccaagga agagaatggc c

分别用 PCR 方法扩增；然后采用重叠区延伸法连接。

3. 表达质粒 pJM- anx32-scuPA，所述表达质粒为长度 6.8 Kb 的环形双链，克隆有编码膜联蛋白 32 和单链尿激酶 144~411 位氨基酸的基因序列，
15 并含有 $P_R P_L$ 启动子。

4. 如权利要求 3 所述的质粒表达载体，所述表达载体是热诱导型的。

5. 表达质粒 pJM- anx32-scuPA 的构建方法，其特征在于包括如下步骤：
将融合基因 anx32-scuPA 用 EcoR I、Sal I 双酶切，然后与用 EcoR I、Sal I
双酶切的载体 pJM 连接。

20 6. 工程菌 K802(pJM- anx32-scuPA)，为大肠杆菌 K802 JLF1，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC No. M201020。

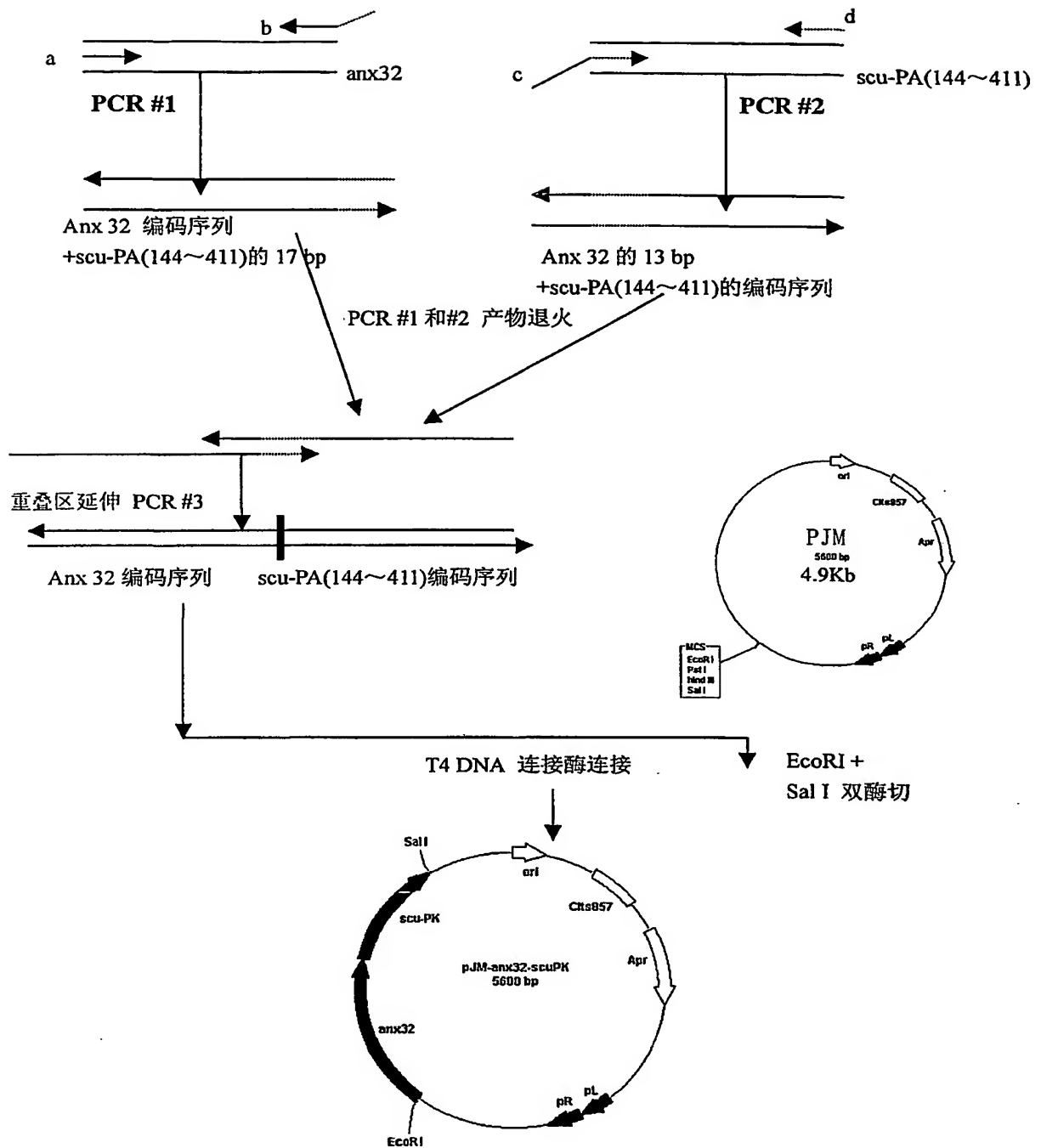


图 1

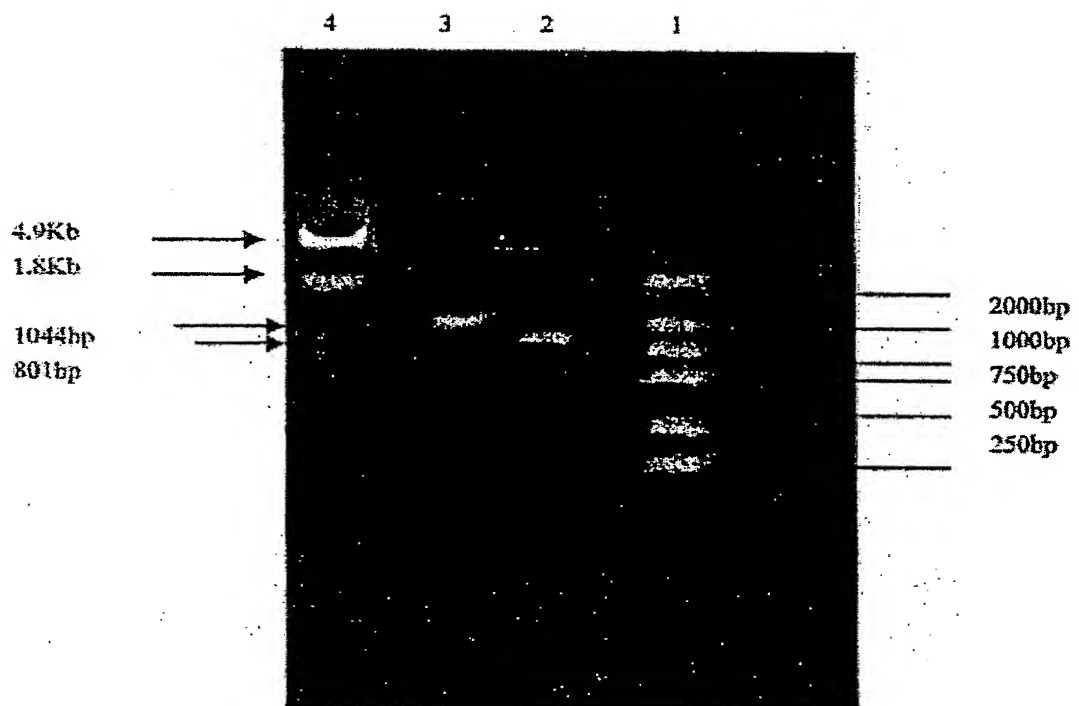


图 2

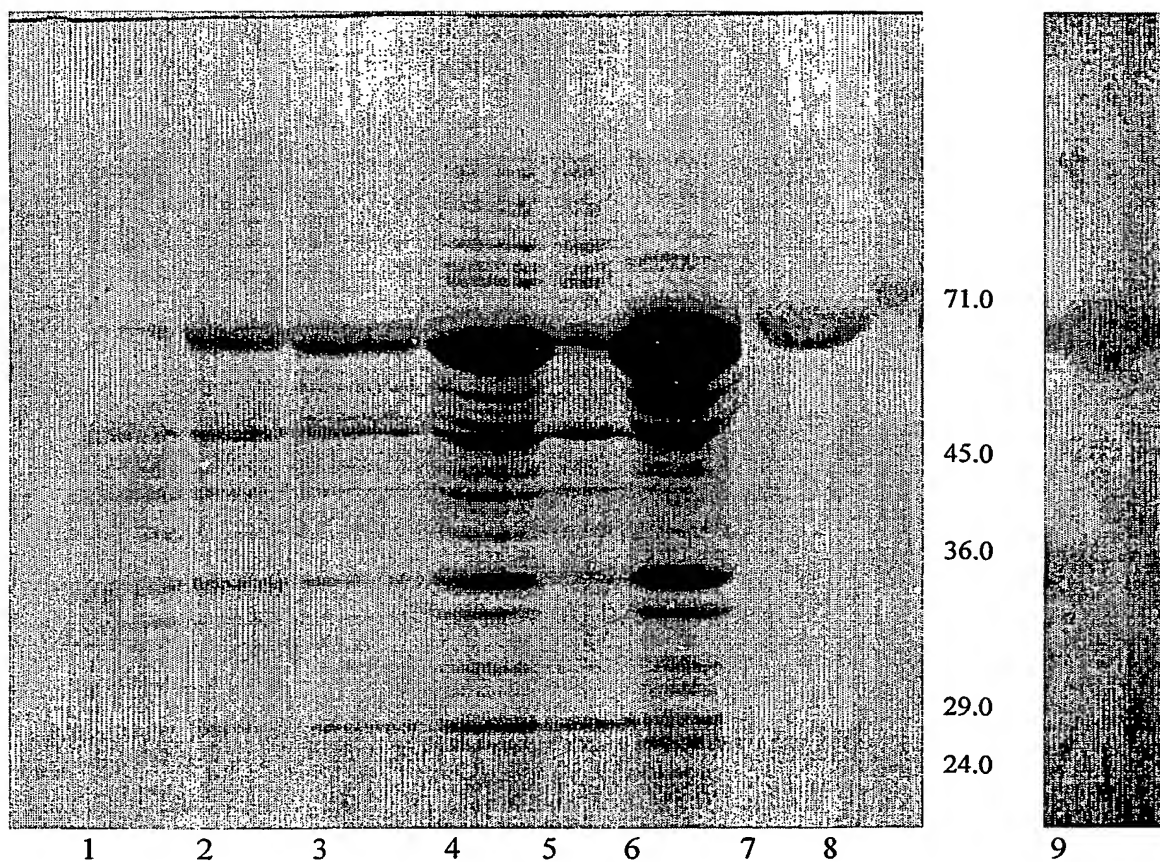


图 3

序列表

(1) 序列 1

a) 序列特征

5 长度: 1044bp

类型: 核酸

链数: 双链

基因库 No. AF147955

几何结构: 线形

10 b) 分子类型: DNA

c) 来源: 猪囊尾蚴

d) 序列描述: SEQ ID No: 膜联蛋白 32

1 atggcctact gtcgtccct ggttcacta tatgccccca atggagagaa gtacaaaccg
61 actattaccc caacacccgg gttctcaccg accgctgatg ctgagcactt gaagcgtgca
15 121 atgcgaggac ttggcacgaa tgaacgtgcg atcattgaca ttcttggaaa ccgaacttca
181 gccgaaagaa tggccattcg tgacgcctat ccgtcgattt ccagcaagac cctgcacgat
241 gctctaacca gcgagctgag tggcaagtgc cggagggttc ccttggttgc aatccaatca
301 ccgtggcagg tgatggcaga ggctctttac gacgccatga agggggctgg cactaaggaa
361 cgcgtactca atgaaattat tgccgggtgt tcaaaggatg acatccctca gttgaaaaaa
20 421 gcttttgaag aagtgagcgg aggagaaacc ctgatgatg cgatcaaggg ggacacgagt
481 ggcgactacc gcgaggccct tctgctagcg ctgcgcggtc aggctgatga accacaggcg
541 atgcaactca aaaacctaac accctccact ctgagtcagg ttgtgaatcc cggccttgct
601 gaaacggatg cgaaggagct gtacgcctgc ggtgaggggc gcccgggcac agcagagagt
661 cgtttcatgc gtcctatcgt caatcgctca ttccttcaat taaacgcaac gaatgaggct
25 721 tacaatcggg cctacgggtca ccggttgatt gatgcaataa agaaggagac gtcgagagac
781 cttgaggact ttctcataac tagagttcgc tacgccactg atcgcgccag tctgtttgcc
841 gaactccttc actttgccat gagaggagct ggcaccaagg actccacttt gcaacgtggt
901 cttgccttga gggctgatac tgatctagga agcatcaagg agaagtatgc ggagctctat
961 ggtgaaacct tggaagcggc aatcaagggt gatacttctg gtgactatga ggctctctgc
30 1021 ttgaaactca tcggccctgc ataa

(2) 序列 2

序列 1 编码的氨基酸序列:

MAYCRSLVHLYAPNGEKYKPTITPTPGFSPTADAEHLKRAMRGLGTNERAIIDILGNRTSAERMAI
RDAYPSISSKTLHDALTSELSGKFRRFALLLIQSPWQVMAEALYDAMKGAGTKERVLNEIIAGCSKDDIPQ
5 LKKAFFEEVSGGETLDDAIKGDTS GDYREALLLALAGQADEPQAMQLKNLTPSTLSQVVNPGLAETDAKELY
ACGEGRPGTAESRFMRPIVNRSLQLNATNEAYNRAYGHPLIDAIIKETSRLDLEFLITRVRYATDRASLF
AELLHFAMRGAGTKDSTLQRVLALRADTDLGSIKEKYAELYGETLEAAIKGDTSGDYALCLKLIGPA

(3) 序列 3

10 a) 序列特征

长度: 801 bp

类型: 核酸

链数: 双链

基因库 No. M15476

15 几何结构: 线形

e) 分子类型: DNA

f) 来源: 人工合成

g) 序列描述: SEQ ID No: scu-PA(144~411)

1 aagaattaaa atttcagtgt ggccaaaaga ctctgaggcc ccgctttaag attattgggg
20 61 gagaattcac caccatcgag aaccagccct ggtttgcggc catctacagg aggcaccggg
121 ggggctctgt cacctacgtg tgtggaggca gcctcatcag cccttgctgg gtgatcagcg
181 ccacacactg cttcattgat tacccaaaga aggaggacta catcgtctac ctgggtcgct
241 caaggcttaa ctccaacacg caaggggaga tgaagtttga ggtggaaaac ctcacctac
301 acaaggacta cagcgctgac acgcttgctc accacaacga cattgccttg ctgaagatcc
25 363 gttccaagga gggcaggtgt ggcagccat cccggactat acagaccatc tgcctgcctt
403 atgtataaag cgatccccag tttggcacia gctgtgagat cactggcttt ggaaaagaga
481 attctaccga ctatctctat ccggagcagc tgaaaatgac tgttgtgaag ctgatttccc
541 accgggagtg tcagcagccc cactactacg gctctgaagt caccacaaa atgctatgtg
601 ctgctgaccc ccaatggaaa acagattcct gccagggaga ctcaggggga cccctcgtct
30 661 gttccctcca aggccgcatg actttgactg gaattgtgag ctggggccgt ggatgtgccc
722 tgaaggacaa gccaggcgtc tacacgagag tctcacactt cttaccctgg atccgcagtc

782 acaccaagga agagaatggc c

(4) 序列 4

序列 3 编码的氨基酸序列:

5 LKFQCGQKTLRPRFKIIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCF
IDYPPKEDYIVYLGSRSLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSR
TIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKML
CAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEEN
GLAL

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN01/01301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N15/62, C12N15/63

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, Genbank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PDB, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	CN1247195(SHANGHAI BIOCHEMISTRY INSTITUTE OF THE CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 15 March 2000 See the whole document.	1-6
A	WO9905277 (MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE [KR/KR]) 4 February 1999 See the abstract and claims.	1-6
A	WO9825641(HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES & DEVELOPMENT COMPANY LTD. [IL/IL]) 18 June 1998	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2002(31.01.02)

Date of mailing of the international search report

21. FEB. 2002 (21.02.02)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

CHANG,mao

Telephone No. 86-10-62093906



Form PCT/ISA/210(second sheet)(July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN01/01301

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
CN1247195	2000-03-15	NONE	
WO9905277	1999-02-04	AU7789498	1999-02-04
		KR230578	1999-12-01
		EP1012289	2000-06-28
		CN1275163	2000-11-29
WO9825641	1998-06-18	AU5191398	1998-07-03
		EP0948342	1999-10-13

A. 主题的分类

IPC⁷ C12N15/62, C12N15/63

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, Genbank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PDB, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	CN1247195(中国科学院上海生物化学研究所) 2000 年 3 月 15 日 见全文。	1-6
A	WO9905277(财团法人牧岩生命工学研究所) 1999 年 2 月 4 日 见权利要求和摘要。	1-6
A	WO9825641(HADASIT 医疗研究服务发展有限公司) 1998 年 6 月 18 日 见权利要求和摘要	1-6

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
“E” x 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的
“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件
“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性
“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性
“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

31.1 月 2002(31.01.02)

国际检索报告邮寄日期

21. 2月 2002(21.02.02)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-10-62019451

受权官员

常 矛

电话号码: 86-10-62093906



国际申请号
PCT/CN01/01301

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN1247195	2000-03-15	无	
WO9905277	1999-02-04	AU7789498 KR230578 EP1012289 CN1275163	1999-02-04 1999-12-01 2000-06-28 2000-11-29
WO9825641	1998-06-18	AU5191398 EP0948342	1998-07-03 1999-10-13

BNSDOCID: <WO_____03008594A1_I_>

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)